

Etude de l'appareil nucléaire du cilié hétérotriche *Climacostomum virens*¹

par

Jean-Denis HUFSCHMID *

Avec 4 planches

ABSTRACT

The nuclear apparatus of the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. — *Climacostomum virens* is a noncontractile heterotrich ciliate about 200 μm long and 100 μm wide. This ciliate has a long, cylindrical, coiled macronucleus ("somatic nucleus") and numerous spherical micronuclei 2 μm in diameter ("germinal nuclei"). The organization of the oral membranelles, the buccal cavity and the somatic kineties are described by scanning electron microscopy. The micronuclei are formed of a very dense chromatin arranged in numerous clusters. The macronucleus (200 μm long and 10 μm wide) contains dense masses of chromatin and thousands of nucleoli of various shapes. Some nucleoli are very large, up to 3 μm in diameter, and possess a dense fibrillar rosette structure and a clear granular center in electronmicrographs. The nucleoli are stained by the protargol impregnation technic. During cell division, the macronucleus undergoes morphological changes: i) the condensation stage, wherein the nucleus becomes spherical, nucleoli completely disappear and chromatin contains only very small, dispersed granules; and ii) the elongation stage, wherein the nucleus elongates to form a long rod extending into each presumptive daughter cell, and during which the nucleoli progressively become visible and increase in volume. When the cleavage furrow appears the nucleoli are still bigger and the cell divides. Just after cleavage some nucleoli have a rosette shape which may correspond to high transcriptional activity. During interphase the nucleoli return to a smaller, regular shape. Chromatin spreadings give the classical nucleosomal bead structure of deoxyribonucleo-proteins (DNP). At other regions wider fibers of ribonucleo-proteins (RNP) are visible and contain irregular granules. One non-nucleolar transcriptional unit is shown. DNA spreading proved that this ciliate has

¹ Poster présenté à l'assemblée annuelle de la SSZ à Berne le 11 et 12 mars 1983.

* Laboratoire de Biologie des Protistes, Département de Biologie Animale, Université de Genève, 3, rue de Candolle, 1211 Genève 4.

very long molecules (20 μm) and is thus comparable to *Paramecium*, a holotrich ciliate, and *Stentor* and *Blepharisma* (heterotrich ciliates), but unlike hypotrichs which have very short, one gene long, molecules.

INTRODUCTION

C. virens est un cilié hétérotriche non contractile. Une redescription récente de ce cilié a été faite par REPAK (1972) et PECK *et al.* (1975). *C. virens* a été utilisé par FISCHER-DEFOY & HAUSMANN (1977, 1981) pour des expériences sur la phagocytose, la fonction et la structure de l'appareil oral. Cet hétérotriche se prête particulièrement bien aux études d'ingestion et de formation des vacuoles digestives. La morphogenèse de division a été décrite par DUBOCHET *et al.* (1979) et celle de régénération par PELVAT *et al.* (1974) et FAHRNI *et al.* (1981). *C. virens* possède la dualité nucléaire typique des ciliés: un macronoyau polygénomique cylindrique et de nombreux micronoyaux diploïdes.

Par la microscopie à balayage nous avons confirmé les observations que nous avons pu faire après imprégnation au protéinate d'argent. Nous nous sommes plus spécialement intéressés ici au macronoyau, à sa structure, sa composition (DNA et chromatine) et au cycle du nucléole pendant le cycle cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche

C. virens a été isolé d'une mare près de Genève. La souche G originelle possède des algues endosymbiotiques (*Chlorella* s.p.) qui peuvent gêner les observations et l'extraction de l'ADN. Nous avons obtenu par traitement au 3-(3,4-Dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU, inhibiteur de la photosynthèse) une souche dépourvue de ces algues (souche Gef — endosymbiont free).

Cultures

C. virens est cultivé dans le milieu de Carter modifié (PECK *et al.* 1975) à 20-22° C et nourri tous les 1, 2 ou 3 jours avec des phytoflagellés *Chlorogonium elongatum* (Cambridge strain 12/2 D). La durée du cycle cellulaire est comprise entre 18 et 26 heures.

Microscopie optique

Les cellules fixées à la solution de Hollande sont imprégnées par le protéinate d'argent suivant TUFFRAU, modifié par DUBOCHET *et al.* (1979). Pour mettre en évidence la nature des granules visibles par la coloration au protéinate d'argent dans le macronoyau, nous avons été amenés à faire des préparations colorées par la méthode de Brachet (images non montrées), spécifiques pour les nucléoles.

Microscopie électronique à balayage

Les macronoyaux préalablement isolés sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2% puis traités ainsi que les cellules entières selon la méthode décrite par SMALL & MARZALEK (1969). Les photos ont été prises sur un microscope ISI Super Mini SEM du Museum d'Histoire Naturelle de Genève.

Microscopie électronique à transmission

Les cellules sont fixées et traitées selon la méthode préalablement décrite par PECK *et al.* (1975).

Isolation des macronoyaux

Les cellules sont traitées par la méthode de CUMMINGS (1977). Après une lyse qui conserve les membranes nucléaires intactes, le lysat complet est chargé sur des coussins de sucrose 2,5; 2 et 1,5 M et centrifugé à 10.000 t/min. pendant 10 minutes sur une centrifugeuse MSE Super Speed 50. Les noyaux sont récoltés au fond du tube.

Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait par la méthode décrite pour Stentor par PELVAT & DE HALLER (1976). Les molécules sont ensuite étalées par la méthode de DAVIS *et al.* (1971).

Etallement de chromatine

Les cellules sont traitées par une méthode communiquée par S. FAKAN et adaptée pour notre matériel de la manière suivante: au tampon de lavage on ajoute 0,1 mM de phénylméthyl-sulfonyl fluorure (PMSF) et 1-2 mM de diéthyl pyrocarbonate, à la solution de lyse (Nonidet P 40) 100 µg/ml d'héparine et de tARN. Le lysat est dilué avec de l'EDTA 0,2 mM, déposé sur un gradient de sucrose-formaldéhyde dans une microchambre et centrifugé à 4.000 g (MILLER & BAKKEN 1972; HUGUES *et al.* 1979). Les photos ont été prises sur un microscope électronique Zeiss M10.

RÉSULTATS

1. Morphologie générale

L'imprégnation au protéinate d'argent met en évidence les structures fibrillaires ainsi que les cinétosomes et les cils, mais aussi colore les macro- et micronoyaux (fig. 1). La zone de membranelles adorales entoure la cavité buccale (fig. 1-4). Sur la face ventrale les cinéties somatiques déterminent une « zone de contraste »: les cinéties de la partie gauche de la cellule sont plus ou moins parallèles à l'axe de la cellule, celles de la partie droite au contraire se disposent de manière oblique, déterminant un triangle sans cinétie très bien visible au microscope optique (fig. 1) et à balayage (fig. 2 et 3). A l'intérieur du cytoplasme on distingue le macronoyau allongé, unique et enroulé sur lui-même, et les nombreux micronoyaux répartis au hasard (nombre irrégulier de 10 à 17) de forme sphérique (2 µm) et apparaissant très foncés à l'imprégnation au protéinate d'argent (fig. 1). Les préparations de microscopie à balayage permettent de voir les cils des cinéties somatiques et des membranelles adorales, ainsi que la régularité de leur implantation (fig. 2-4).

2. Morphologie des macronoyaux isolés

Les macronoyaux isolés apparaissent au microscope à balayage avec une surface couverte de rugosités (restes de cytoplasme?) (fig. 5), ils sont de longueur très variables de 70 à 315 µm et de 5 à 14 µm d'épaisseur. Les noyaux imprégnés au protéinate d'argent permettent de voir les très nombreux nucléoles (estimation de 1000 à 3000 au moins

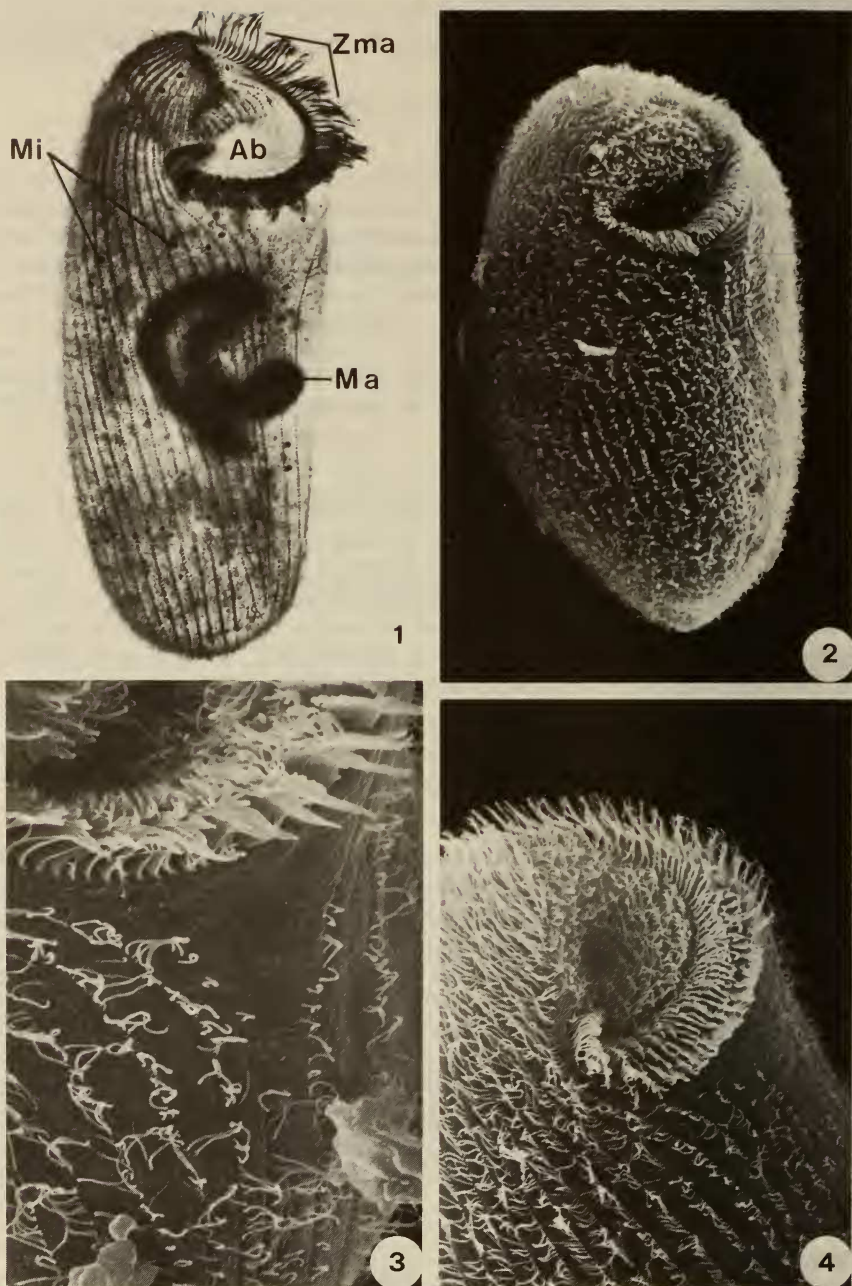


PLANCHE I

Morphologie générale de *Climacostomum virens*.

FIG. 1. Micrographie optique de *C. virens*, coloration au protéinate d'argent $G = 360\times$. Ab = appareil buccal, Ma = macronoyau, Mi = micronoyaux, Zma = zone de membranelles adorales. FIG. 2, 3, 4. Micrographies électroniques à balayage de *C. virens*. FIG. 2. Cellule entière $G = 300\times$. FIG. 3. Détail des membranelles adorales et des cinéties obliques $G = 1060\times$. FIG. 4. Détail de la région buccale $G = 530\times$.

suivant le stade du cycle cellulaire), le plus souvent sphériques, mais parfois de forme plus irrégulière (fig. 6).

3. Ultrastructure des macro- et micronoyaux

Au microscope électronique le macronoyau comprend 3 structures: l'une composée de corps denses de petite taille irrégulière qui correspondent à la condensation localisée de la chromatine; des structures de grandes tailles comportant des zones très denses,

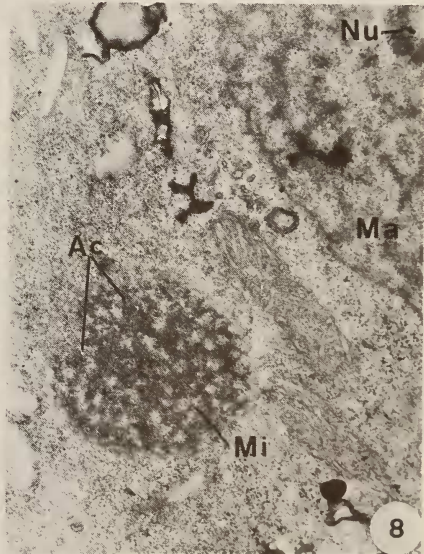
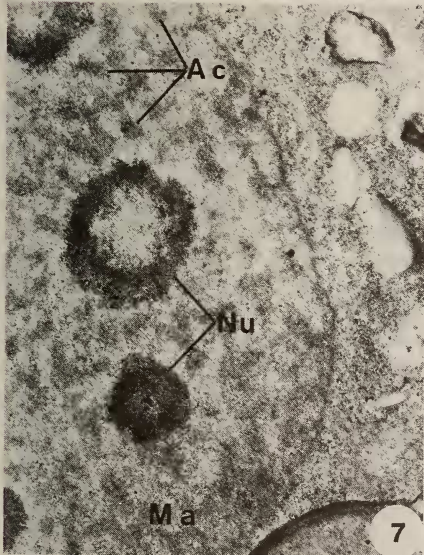
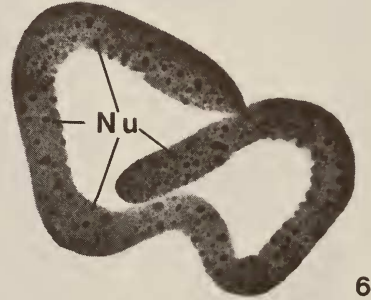
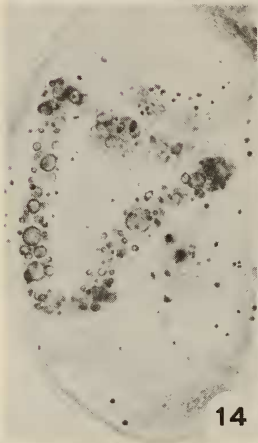
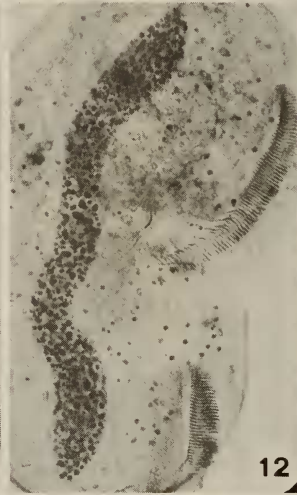
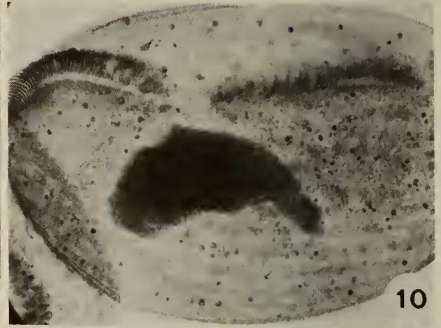
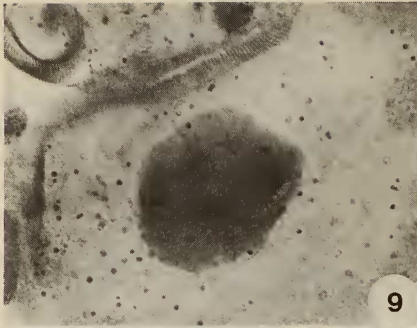


PLANCHE II

Morphologie et ultrastructure des micro- et macronoyaux.

FIG. 5. Micrographie de macronoyau isolé (balayage) $G = 580 \times$. FIG. 6. Micrographie optique de macronoyau isolé coloré au protéinate d'argent montrant les nombreux nucléoles (Nu) $G = 425 \times$. FIG. 7. Micrographie montrant une coupe à travers un macronoyau (Ma) contenant des amas de chromatine (Ac) et des nucléoles (Nu) sphériques pleins et avec un « anneau » de matériel dense $G = 9580 \times$. FIG. 8. Micrographie montrant le micronoyau (Mi) avec des amas de chromatine (Ac) très dense et le macronoyau (Ma) contenant les nucléoles (Nu) $G = 9580 \times$.



les nucléoles; le nucléoplasme très clair qui correspond à des zones de matière diffuse (fig. 7, 8). Les nucléoles ne sont pas localisés à proximité de la membrane nucléaire. Certains peuvent avoir une structure « en anneau » (sphère creuse): la partie extérieure est très dense et fibrillaire, le centre beaucoup plus clair, à caractère granulaire. D'autres nucléoles possèdent un centre très dense aux électrons. Les pores de la membrane nucléaire ne sont pas bien visibles. Les micronoyaux toujours de forme très sphérique ne sont constitués que par 2 structures, le nucléoplasme très clair comme celui du macronoyau et des amas de chromatine beaucoup plus denses que ceux du macronoyau et montrant une condensation maximum du matériel (fig. 8). Les micronoyaux ne possèdent pas de nucléole.

4. Cycle des nucléoles pendant la division cellulaire

Lors de la division cellulaire le macronoyau passe par un cycle de condensation-élongation (fig. 9-13). Le macronoyau très allongé et enroulé sur lui-même prend une forme sphérique. Cette condensation s'accompagne de la disparition totale des nucléoles (fig. 9 et 10). Pendant l'allongement progressif qui suit, le noyau prend une forme de losange (fig. 11). Les nucléoles réapparaissent lentement sous formes de très petits grains. Lors de la répartition du macronoyau entre les 2 cellules filles, les extrémités s'arrondissent et les nucléoles augmentent encore de volume (fig. 12). Au moment de l'apparition du sillon de division, le macronoyau possède déjà une forme allongée avec des nucléoles bien visibles (fig. 12 et 13). Après le clivage, le macronoyau qui continue à s'allonger a moins de nucléoles. Leur taille est hétérogène, certains ayant une forme en « anneau » (fig. 14). Plus tard dans l'interphase, le macronoyau reprend sa longueur normale et les nucléoles un volume plus régulier (fig. 15 et 16).

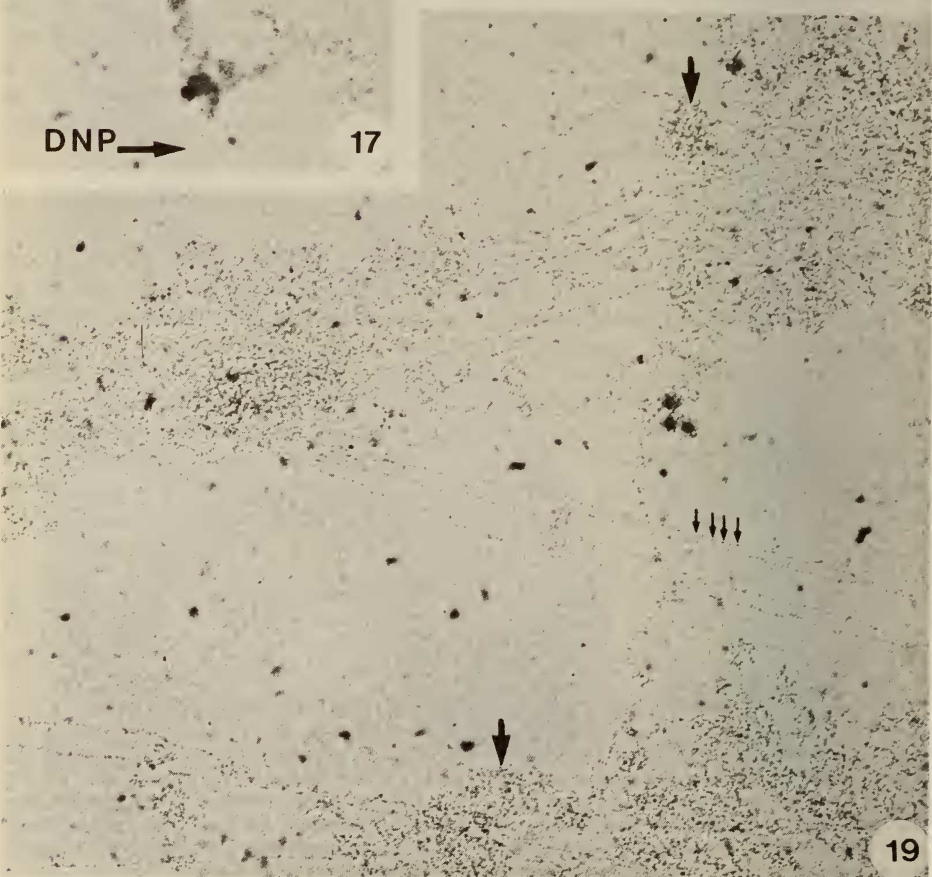
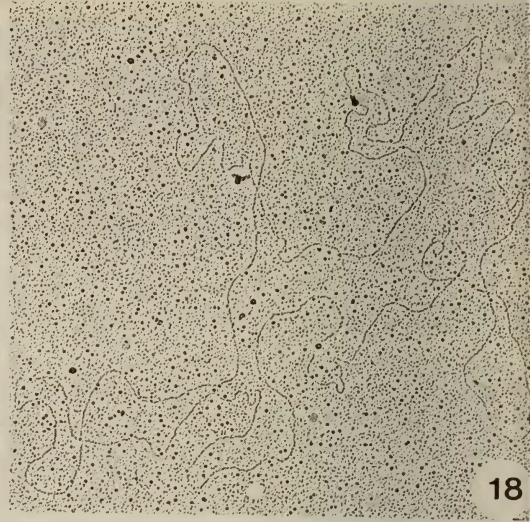
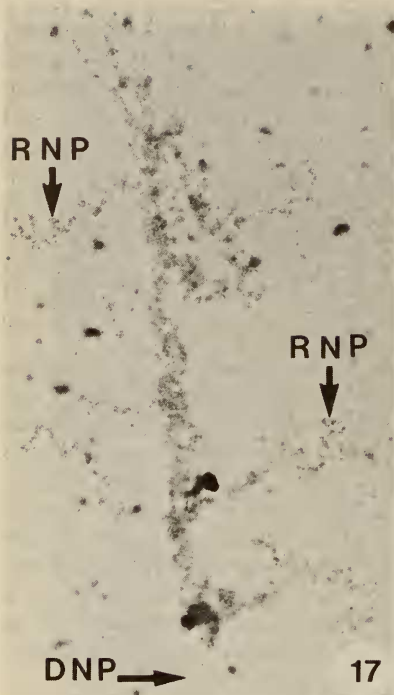
5. Structure de la chromatine et longueur des molécules d'ADN

Lors des étalements, la chromatine de *C. virens* se disperse irrégulièrement; il est possible de déterminer de grandes régions inactives mélangées à des zones plus rares, contenant des complexes de transcription. Les parties inactives se composent de fibres d'ADN sur lesquelles sont disposées la structure répétitive caractéristique des nucléosomes en « collier de perles ». Ces zones peuvent être longues et comporter des portions où la structure de RNP des nucléosomes devient moins régulière ou même absente (fig. 19). Les complexes de RNP diffèrent des fibres de DNP par une plus grande épaisseur et par l'irrégularité et la grosseur des granules qui l'entourent, mais aussi par l'enchevêtrement de ces filaments multiples (fig. 19). La figure 17 montre une unité de transcription non nucléolaire: structure caractéristique des nucléosomes (DNP) de la fibre centrale d'ADN,

PLANCHE III

Description des nucléoles pendant le cycle du macronoyau.

FIG. 9 à 16. Coloration au protéinate d'argent $G = 300\times$. FIG. 9. Stade de condensation du macronoyau montrant la disparition des nucléoles. FIG. 10. Fin de la condensation et début de l'allongement du macronoyau avec réapparition de très fins et très nombreux nucléoles. FIG. 11, 12, 13. Trois stades d'allongement progressif du macronoyau avec les stades de réapparition des nucléoles. FIG. 14. Stade du macronoyau interphasique montrant les nucléoles hypertrophiés avec une structure en « anneau ». FIG. 15, 16. Stade du macronoyau interphasique montrant les nucléoles encore relativement gros.



sur laquelle viennent se brancher les complexes nombreux de RNP contenant l'ARN qui vient d'être synthétisé. Les fibres de RNP sont d'épaisseur variable et les granules ont des tailles hétérogènes.

La fig. 18 montre une molécule d'ADN préalablement extraite et purifiée qui mesure 20 μm . D'autres étalements confirment que *C. virens* possède de très longues molécules, souvent difficiles à mesurer.

DISCUSSION

Dans cette étude nous avons décrit la morphologie générale de *C. virens* au microscope à balayage et fait une première approche de la compréhension de la structure de l'appareil nucléaire. Comme les hétérotriches *Stentor coeruleus* (PELVAT & EMERY 1982), *Blepharisma americanum* (JENKINS 1977) et *Condylostoma magnum* (BOHATIER 1978), *C. virens* possède plusieurs micronoyaux et un macronoyau unique allongé contenant beaucoup de nucléoles. Les macronoyaux isolés de *C. virens* montrent au microscope à balayage une surface bien plus irrégulière et assez différente de celle décrite par LEICK *et al.* (1979) chez *Tetrahymena thermophila* qui possède une surface ondulante avec beaucoup de dépressions et parties saillantes recouvrant les nucléoles attachés sous les membranes nucléaires. Pour bien caractériser ces détails morphologiques nous avons d'abord prouvé que les granules argentophiles de l'imprégnation au protéinate correspondaient aux nucléoles par une étude parallèle avec la coloration de Brachet qui met en évidence ADN et ARN. Le nombre plus élevé de nucléoles que chez les autres hétérotriches et l'holotriche *Tetrahymena* signifie-t-il une amplification plus importante chez *C. virens*? La structure et l'ultrastructure des nucléoles diffèrent aussi par leur conformation des hétérotriches cités: d'une part par l'absence de structure trabéculaire où se trouve généralement l'organisateur nucléolaire et d'autre part par les nucléoles « en anneau » ou sphères creuses qui ne ressemblent qu'à ce que l'on trouve chez *Dileptus anser* (BOHATIER 1978) et chez *Blepharisma wardsi* (INABA & SOTOKAWA 1968), mais chez ce dernier organisme, cette structure n'existe qu'au moment de la condensation. Le nucléole à structure « en anneau » correspondrait à une phase de forte transcription, comme on peut le voir pendant la phase stationnaire précédant l'autogamie chez *Paramecium tetraurelia* (HEIFETZ & SMITH-SONNEBORN 1981). La place des nucléoles de *C. virens* est différente de ce que l'on a chez *Tetrahymena pyriformis* (NILSSON & LEICK 1970), où ils sont rattachés à la membrane nucléaire. Le cycle des nucléoles passe par un stade de disparition totale qui pourrait être la phase de réorganisation du génome avant la division appelée « poorly visible stage » par WILFERT (1972) chez *Blepharisma americanum*.

PLANCHE IV

Structure de la chromatine et longueur des molécules d'ADN de *C. virens*.

FIG. 17. Etalement de chromatine montrant une unité de transcription non-nucléolaire avec la fibre de déoxyribonucléo-protéine (DNP) et les nombreuses fibres de ribonucléo-protéines (RNP) caractérisant les transcriptions d'ARN $G = 30000 \times$. FIG. 18. Etalement d'une longue molécule d'ADN (20 μ) $G = 17500 \times$. FIG. 19. Etalement de chromatine montrant les régions de DNP avec la structure caractéristique des nucléosomes (petites flèches) et les régions de transcription comportant un réseau touffu de RNP (grandes flèches) $G = 24000 \times$.

Les étalements de chromatine des ciliés semblent être plus difficiles à réaliser que ceux des eucaryotes supérieurs à cause de la nature polygénomique et de la multitude des nucléases et protéases des macronoyaux. Seule une comparaison existe avec *Paramecium primaurelia* (SAMUEL *et al.* 1981) qui montre aussi la structure « en collier » des nucléosomes, mais aussi des globules supranucléosomiaux que nous n'avons pas vus chez *C. virens*, et des zones de transcription non-nucléolaires avec des unités distinctes. Nous n'avons pas non plus découvert de transcriptions nucléolaires. Les étalements de chromatine d'*Amoeba proteus* (MURTI & PRESCOTT 1978) bien que réalisés par une méthode impliquant une purification préalable des noyaux obtiennent des images similaires aux nôtres.

Les hétérotriches *C. virens*, *Stentor coeruleus* (PELVAT & DE HALLER 1976) et *Blepharisma japonicum* (HUFSCHMID, résultats non publiés) possèdent tous un même type d'organisation du macronoyau: très longues molécules d'ADN contenant beaucoup de gènes comme chez *Paramecium primaurelia* (CUMMINGS 1975). Cette organisation du matériel génétique du macronoyau est de plus confirmée par les gels d'agarose de l'ADN qui montrent une seule large bande de très haut poids moléculaire (HUFSCHMID, résultats non publiés), très différent du modèle des hypotriches (LAWN *et al.* 1978) qui ne possèdent que de très courtes molécules (1 à 3 μm) contenant juste assez de nucléotides pour coder un seul gène.

RÉSUMÉ

Le *Climacostomum virens* est un cilié hétérotriche non contractile d'une longueur d'environ 200 μm et de 100 μm de large. Ce cilié possède un long macronoyau cylindrique, enroulé sur lui-même (« noyau somatique ») et de nombreux micronoyaux sphériques de 2 μm de diamètre (« noyau germinal »). L'organisation des membranelles orales, la cavité buccale et les cinéties somatiques sont décrites en microscopie électronique à balayage. Les micronoyaux sont formés d'amas de chromatine très dense. Le macronoyau (200 μm de long et 10 μm de large) contient des corpuscules de chromatine dense et des milliers de nucléoles de taille variable. Certains nucléoles sont très gros, jusqu'à 3 μm de diamètre, et ils possèdent une structure externe fibrillaire « en anneau » et un centre très clair, granulaire, en microscopie électronique. Les nucléoles sont aussi étudiés par la technique d'imprégnation au protéinate d'argent. Pendant la division cellulaire le macronoyau subit des changements morphologiques: a) un stade de condensation, où le noyau prend une forme sphérique, les nucléoles disparaissent complètement et la chromatine ne contient que de très petits granules dispersés; et b) un stade d'élongation, où le noyau s'allonge pour former un long ruban qui se répartit entre les 2 cellules filles, et où les nucléoles réapparaissent progressivement et augmentent de volume. Lorsque le sillon de division se forme, les nucléoles sont déjà gros et la cellule se divise. Juste après le clivage certains nucléoles ont une structure « en anneau » qui pourrait correspondre à une grande activité de transcription. Pendant l'interphase, les nucléoles reprennent une forme plus petite et régulière. Les étalements de chromatine montrent la structure classique des nucléosomes en collier de perles des DNP. A d'autres régions, on trouve de larges fibres de RNP contenant des granules irréguliers. Une unité de transcription non nucléolaire est aussi décrite. Les étalements d'ADN prouvent que ce cilié possède de très longues molécules (20 μm) et de ce fait est comparable à *Paramecium*, cilié holotriche et à *Stentor* et *Blepharisma* (ciliés hétérotriches), mais au contraire des hypotriches qui possèdent de très courtes molécules, d'une longueur d'un seul gène.

REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement le professeur G. de Haller, directeur de notre laboratoire, de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions également le Dr. S. Fakan de l'Isrec à Lausanne pour l'aide qu'il a bien voulu nous accorder pour les étalements de chromatine, C.-F. Dubochet pour les imprégnations aux protéinates d'argent, le Dr R. Peck pour les préparations de coupes des noyaux en microscopie à transmission, le Dr J. Wuest pour la microscopie à balayage, B. Pelvat et R. Peck pour leur critique et leurs conseils ainsi que l'assistance technique de M^{mes} M.-P. Barillat, M. Maye et E. Martinez.

Travail effectué avec l'aide du Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (subside N° 3.657.0.80).

BIBLIOGRAPHIE

- BOHATIER, J. 1978. Contribution à l'étude de la morphogenèse de régénération chez les protozoaires ciliés des genres *Dileptus* et *Condylostoma*. Thèse Univ. Clermont-Ferrand. N° 251.
- CUMMINGS, D. J. 1975. Studies on macronuclear DNA from *Paramecium aurelia*. *Chormosoma* 53: 191-208.
- 1977. Methods for the isolation of nuclei from ciliated protozoans. *Methods Cell Biol.* 14: 97-112.
- DAVIS, R. W., M. SIMON and M. DAVIDSON. 1971. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. *Methods Enzymol.* 21 D: 413-428.
- DUBOCHET, C.-F., R. K. PECK and G. de HALLER. 1979. Morphogenesis in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. I. Oral development during cell division. *J. Protozool.* 26: 218-226.
- FAHRNI, J. F., C. DUBOCHET and G. de HALLER. 1981. Morphological and functional studies of oral regeneration by the protozoon *Climacostomum virens* (Ciliophora, Heterotrichida). IX. Congr. Int. Soc. Dev. Biol. Basle, p. 160.
- FISCHER-DEFOY, D. und K. HAUSMANN. 1977. Untersuchungen zur Phagozytose bei *Climacostomum virens*. *Protistologica* 13: 459-476.
- FISCHER-DEFOY and K. HAUSMANN. 1981. Microtubules, microfilaments, and membranes in phagocytosis: structure and function of the oral apparatus of the ciliate *Climacostomum virens*. *Differentiation* 20: 141-151.
- HEIFETZ, S. R. and J. SMITH-SONNEBORN. 1981. Nucleolar changes in aging and autogamous *Paramecium tetraurelia*. *Mech. Ageing Develop.* 16: 255-263.
- HUGHES, M. E., K. BÜRKI and S. FAKAN. 1979. Visualization of transcription in early mouse embryos. *Chromosoma* 73: 179-190.
- INABA, F. and Y. SOTOKAWA. 1968. Electron microscopic observation on nuclear events during binary fission in *Blepharisma wardsi* (Ciliata, Heterotrichida). *Japan. J. Genetics* 43: 335-348.
- JENKINS, R. A. 1977. The role of microtubules in macronuclear division of *Blepharisma*. *J. Protozool.* 24: 264-275.
- LAWN, R. M., J. M. HEUMANN, G. HERRICK and D. M. PRESCOTT. 1978. The gene-size DNA molecules in *Oxytricha*. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 47: 483-492.
- LEICK, V., B. BRO and A. LIMA-DE-FARIA. 1979. Scanning electron microscopy of the nuclei and nucleoli in *Tetrahymena*. *Hereditas* 90: 219-226.

- MILLER, O. I. and A. H. BAKKEN. 1972. Morphological studies of transcription. *Acta endocrinol.* Suppl. 168: 155-177.
- MURTI, K. G. and D. M. PRESCOTT. 1978. Electron microscopic visualization of transcribed genes in the nucleus of *Amoeba proteus*. *Expt. Cell Res.* 112: 233-240.
- NILSSON, J. R. and V. LEICK. 1970. Nucleolar organization and ribosome formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Expt. Cell Res.* 60: 361-372.
- PECK, R. K., B. PELVAT, I. BOLIVAR and G. de HALLER. 1975. Light and electron microscopic observations on the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. *J. Protozool.* 22: 368-385.
- PELVAT B. et R. EMERY. 1982. La régénération de l'appareil oral chez *Stentor coeruleus*: II-Modifications de l'ultrastructure du macronoyau. *Protistologica* 18: 371-387.
- PELVAT, B. and G. de HALLER. 1976. Macronuclear DNA in *Stentor coeruleus*. A first approach to its characterization. *Genet. Res.* 26: 277-289.
- PELVAT, B., R. PECK, I. BOLIVAR, R. POGGIA et G. de HALLER. 1974. Premières observations sur la régénération de l'appareil oral chez *Climacostomum virens* (cilié hétérotriche). Comparaison avec la division. *J. Protozool.* 21. Suppl.: 474.
- REPAK, A. J. 1972. A redescription of *Climacostomum virens* (EHRENBERG) STEIN and proposal of a new heterotrich ciliate family, Climacostomidae fam. n. *J. Protozool.* 19: 417-427.
- SAMUEL, C., J. MACKIE and J. SOMMERVILLE. 1981. Macronuclear chromatin organization in *Paramecium primaurelia*. *Chromosoma* 83: 481-492.
- SMALL, E. and D. MARSZALEK. 1969. Scanning electron microscopy of fixed, frozen dried protozoa. *Science, N. Y.*, 163: 1064-1065.
- WILFERT, M. 1972. Zytologische Untersuchungen an dem Ciliaten *Blepharisma americanum* SUZUKI 1954, Stamm Berlin (Heterotrichida Spirostomatidae) sowie Bemerkungen zur Taxonomie und Systematik des Gattung *Blepharisma* PERTY 1849. *Arch. Protistenk.* 114: 152-230.
-